

(19)日本特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-504678

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)6月2日

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 N 9/64	Z	9161-4B	
A 61 K 37/465	ACB	8314-4C	
C 12 N 5/10			
	8931-4B	C 12 N 15/00	A
	9281-4B	5/00	B
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)		最終頁に続く
(21)出願番号	特願平4-507422	(71)出願人	ザイモジエネティクス, インコーポレイテ イド
(86) (22)出願日	平成4年(1992)2月28日		アメリカ合衆国, ワシントン 98105, シ アトル, ノースイースト, ルーズベルト ウェイ 4225
(85) 領訳文提出日	平成5年(1993)8月27日	(71)出願人	ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ ブ
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 0 1 6 3 6		デンマーク国, デーラー-2880 バグスバ ルト, ノボ アレ (番地なし)
(87)国際公開番号	W O 9 2 / 1 5 6 8 6	(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(87)国際公開日	平成4年(1992)9月17日		
(31)優先権主張番号	6 6 2, 9 2 0		
(32)優先日	1991年2月28日		
(33)優先権主張国	米国(US)		
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 修飾されたファクターVII

## (57)【要約】

血栓凝固カスケードを効果的に中断する化合物を製造するためにファクターVIIの触媒活性部位が修飾される。この修飾は、ファクターVIIが血漿ファクターX又はIXを活性化することを実質的に不可能にする。修飾されたファクターVIIの医薬組成物は種々の凝固関連疾患の治療のために使用される。

## 請求の範囲

1. 患者において血栓凝固を阻害する方法であって、血凝ファクターX又はIXを活性化する薬剤されたファクターVIIの能力を実質的に阻害する薬剤を、その触媒中に少なくとも1つ有するファクターVIIを含んで成る組成物の療法的有効量を患者に投与する、ことを含んで成る方法。

2. 前記薬剤がファクターVIIとセリンプロテアーゼ阻害剤との反応を含んで成る、請求項1に記載の方法。

3. 前記阻害剤が有機リノール酸、スルファニルフルオリド、ペブチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項2に記載の方法。

4. 前記阻害剤が、D-Phe-Pro-Arg クロロメチルケトン又はダンシル-Gly-Gly-Arg クロロメチルケトンから選択されたペブチドハロメチルケトンである、請求項2に記載の方法。

5. 前記ファクターVIIの薬剤が、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入又は除去を含んで成る、請求項1に記載の方法。

6. 血凝因子X又はIXを活性化する薬剤されたファクターVIIの能力を実質的に阻害する薬剤を少なくとも1箇所を中心内に有するファクターVIIを、遮蔽として許容されるキャリヤーと共に含んで成る医薬組成物。

7. 前記薬剤が、ファクターVIIとセリンプロテアーゼ阻害剤との反応を含んで成る、請求項6に記載の医薬組成物。

8. 前記阻害剤が有機リノール酸、スルファニルフルオリド、ペブチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項6に記載の医薬組成物。

21. ヒト由来である、請求項13に記載の薬剤されたファクターVII。

22. ウシ由来である、請求項13に記載の薬剤されたファクターVII。

23. 実質的に純粋である、請求項13に記載の薬剤されたファクターVII。

24. その活性化部位において開裂される、請求項13に記載の薬剤されたファクターVII。

25. 組織因子に結合する、請求項13に記載の薬剤されたファクターVII。

26. 組織因子への結合について性別型ファクターVIIaと性差する、請求項13に記載されたファクターVIIa。

27. 2つの作用可及性に選択された蛋白コード領域を含んで成るポリリクオチド分子であって、それぞれ、ブレーブロペプチドとビタミンK依存性蛋白質のelaiドメイン、並びにSer、Asp及びHisの触媒トライアド中に少なくとも1つのアミノ酸置換を有するelaiドメイン不含有ファクターVIIをコードしており、ここで発現の際は前記ポリリクオチドは、活性ファクターX又はIXを活性化する能力が実質的に低下している薬剤されたファクターVII分子をコードする、ことを特徴とするポリリクオチド分子。

28. 前記アミノ酸置換を有する触媒トライアドがSer<sub>111</sub>、Asp<sub>112</sub>及びHis<sub>113</sub>から構成されている、請求項27に記載のポリリクオチド分子。

29. 請求項27のポリリクオチド分子によりトランスクレプトされた構造セルライン。

30. 前記触媒トライアドがヒトファクターVIIのSer<sub>111</sub>、Asp<sub>112</sub>及びHis<sub>113</sub>である、請求項29に記載の方法。

7. 前記阻害剤が、D-Phe-Pro-Arg クロロメチルケトン又はD-ダンシル-Gly-Gly-Arg クロロメチルケトンから選択されたペブチドハロメチルケトンである、請求項6に記載の医薬組成物。

10. 前記ファクターVIIの薬剤が、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入又は除去を含んで成る、請求項13に記載の医薬組成物。

11. ファクターVIIがヒト由来である、請求項6に記載の医薬組成物。

12. 前記薬剤されたファクターVIIがヒト由来である、請求項6に記載の医薬組成物。

13. 血凝ファクターX又はIXを活性化するファクターVIIaの能力を実質的に阻害する、Ser、Asp及びHisの触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸置換を含んで成る、ファクターVII。

14. 前記触媒トライアドがSer<sub>111</sub>、Asp<sub>112</sub>及びHis<sub>113</sub>から構成される、請求項13に記載の薬剤されたファクターVII。

15. 前記アミノ酸置換がヒト由来である、請求項14に記載の薬剤されたファクターVII。

16. 前記置換がSer<sub>111</sub>においてである、請求項15に記載の薬剤されたファクターVII。

17. Ser<sub>111</sub>がGlu、Gly、Val又はThrにより置換されている請求項16に記載の薬剤されたファクターVII。

18. Asp<sub>112</sub>がGluにより置換されている、請求項17に記載の薬剤されたファクターVII。

19. His<sub>113</sub>がLys又はArgにより置換されている、請求項18に記載の薬剤されたファクターVII。

20. His<sub>113</sub>がLys又はArgにより置換されている、請求項19に記載の薬剤されたファクターVII。

## 明細書

## 薬剤されたファクターVII

## 発明の分野

本発明は沈黙凝固系として有用な蛋白質に関する。さらには詳しくは、本発明は血栓凝固を阻害するファクターVIIの薬剤形に関する。

## 発明の背景

血栓凝固は、最終的にフィブリンクロットを生じさせる複数の血液成分又は因子の複雑な相互作用から成る過程である。一般に、基質「カスケード」と称されていることに開闢する血液成分は、活性化物質の作用によりそれ自身活性化された凝固因子である蛋白質分解酵素に転換される酵素的に不活性な蛋白質、すなわちDPL酵素又はザイモゲン（zymogen）である。この複雑な転換を受けた凝固因子は一般に「活性因子」と称され、そして小文字の「a」の略字により示される（例えば、ファクターVIIa）。

活性化されたファクターX（「Xa」）はプロトロンビンのトロンビンへの転換のために必要であり、このトロンビンは次に、フィブリンクロットの形成の最終段階としてフィブリノーゲンをフィブリリンに転換する。ファクターXの活性化を促進する2つの系又は経路が存在する。「内因経路（intrinsic pathway）」は、血漿中のろ存在する因子の作用によりトロンビン形成を導く反応を駆動する。一連のプロテアーゼ介在活性化が最終的にファクターXaを生じさせ、これでファクターVIIaと組合せにおいてファクターXをXaに開裂させる。血栓凝固の「外因経路（extrinsic pathway）」において、ファクターVIIaとそのコファクター、すなわち組織

因子、により同じ蛋白質分解が行われる。組織因子は脂結合蛋白質であり、そして通常は血栓中で循環しない。しかしながら、血管の壁膜の隙間、このもののCa<sup>2+</sup>及びリガンドの存在下でファクターVIIaと蛋白質を形成することによりファクターXの活性化又はファクターIXの活性化を触媒する (Nemerson及びQuesley, *Biochem.*, 25: 4020-4033 (1980))。血栓におけるこれら2つの凝固経路の相対的重要性は明らかでないが、近年、ファクターVII及び組織因子が血栓表面の創傷において要の役割を演ずることが見出された。

ファクターVIIは第一級サイメーゲンとして血栓中を循環する凝血の血栓蛋白質である。サイモグリは触媒的不活性である (Williamsら, *J. Biol. Chem.*, 284: 7536-7543 (1989); Raoら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6687-6691 (1988))。単純因子VIIは、ファクターXa、ファクターVIIa及びファクターIXa又はトロンビンによりイジーピトロで2本鎖ファクターVIIaに転換される。ファクターXaはファクターVIIaによる活性の凝血活性化を有すると言えられる。止血と凝固と他のいくつかの血栓蛋白質と同様に、ファクターVIIはその活性のためにビタミンKに依存し、それは、蛋白質のアミノ酸群に封がっている多数のグルタミン酸残基のカーボンカルボキシル化のために必要である。これらのカーボンカルボキシル化グルタミン酸は、リン群質と共に、ファクターVIIの全員在と相互作用のために必要である。

サイモグリであるファクターVIIの活性化2本鎖分子への転換は、分子の中央近くに位置する内部ペプチド結合の開裂により起こる。ヒトファクターVIIにおいて、活性化凝血酵素はArie等 (1981) である (Hagenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2412-2416 (1981); Thibault, *Biochem.*, 27: 7785-7790 (1988)、この両者を引用により本明細書に組み入れる)。ウシ因子VIIは凝固のArg<sup>143</sup>-Ile<sup>144</sup>結合

における開裂により活性化される (Takeyaら, *J. Biol. Chem.*, 263: 14888-14897 (1988))。組織因子、リン群質及びカルシウムイオンの存在下で、2本鎖ファクターVIIaは通常の蛋白質分解によりファクターX又はファクターIXを急速に活性化する。

患者において凝固カスケードを遮断的にブロックすることがしばしば必要である。抗凝固剤、例えばヘパリン、クマリン、クマリンの誘導体、インダゾンオラン導体、又は他の凝固剤を、例えば腎臓透析の間に、蛋白質錠血栓、蛋白質錠内凝固 (DIC)、及び他の疾患の持主の治療のために使用することができる。例えば、ヘパリン治療、又はクエン酸イオンによる体外処理 (米国特許公報 4,500,309) を透析において用いて凝固の間の凝固を防止することができる。ヘパリンはまた、外科手術を受ける患者における腎臓錠血栓の予防においても有用である。

しかしながら、ヘパリン及び他の抗凝固剤は不所要の副作用を有することがある。入手可能な抗凝固剤は一概に、凝固部位で特異的に作用するのではなく、むしろ全体で作用する。例えば、ヘパリンは直後の出血を惹起するであろう。さらには、約80分間の半減期をもって、ヘパリンは血栓から象徴に離され、凝固錠投与しなければならない。ヘパリンはアンチトロンビン (AT) のコファクターゼとして作用し、そしてATはDICの治療において急速に活性化されるので、適切なヘパリン投与量を維持することがしばしば困難であり、AT直及びヘパリンのペルの連続的なモニターリングが必要である。ヘパリンはまた、ATの効果が強いためには効果がない。さらには、ヘパリンの長期の使用は血栓小板の収縮を増加させ、そして血小板の数を減少させ、そして凝固錠の進行に寄与する。インダゾンオラン導体も凝固錠作用を有する。

上に簡単に記載した抗凝固剤に加えて、幾つかの天然蛋白質が有

凝固活性を有することが知られている。例えば、Restallungsgerber (米国特許公報 4,738,018) はウシ大動脈及びヒトのヘソツ、肺動脈から凝固蛋白質を単離した。Vakili (米国特許公報 4,732,391) はヒト肺動脈由来の凝固蛋白質を示している。さらには、ATは療法的抗凝固剤として使用されている (Schipperら, *Science* 180(88): 854-856 (1978); Jordan, ミ국特許公報 4,386,025; Bockら, 米国特許公報 4,517,294)。

比較的低量で投与することができ、そして伝統的な抗凝固組成物が有する抗凝固作用を生じさせない抗凝固活性を有する改変された組成の必要性がなお世界界に存在する。本発明は、抗凝固部位において特異的に作用し、そしてさらには他の関連の利点を提供する抗凝固剤を提供することによりこの要求を満たすものである。

#### 発明の要約

抗凝固性を有する修飾されたファクターVIIを含んで成る新規な組成物が後述される。ファクターVIIXaは少なくとも1個のアシノ酸修飾を有し、この修飾は、血栓ファクターX又はIXの活性化を触媒する活性化されたファクターVIIの能力を低下させ、そしてそれにより凝固活性を阻害することができるようにより選択される。新規ファクターVIIは少なくとも1個のアミノ酸修飾によって修飾された活性部位を有し、そしてその修飾された形態において組織因子と結合することができる。

本発明の組成物は、医薬組成物に擬似化された場合に患者を治療するための方法において特に有用であり、ここでこれらは、凝固性凝固性を治療するために、幾種の先天性状態を有する個体に投与される。組織因子に結合することができるかしかし凝固カスケード中の他の因子の活性化を触媒する能力が実質的に低下している前記の

ごとのファクターVII分子は、より長い血栓性凝固素を有し、そしてそれ故に他の抗凝固剤と比較した場合に、凝固活性の対応して一層高い効率を有するであろう。本発明の組成物においての医薬的構成は、抗凝固剤により一概に治療されるもの、例えば深部静脈血栓、肺血栓、悪性、敗血症性凝固性内凝固 (DIC) 及び凝固錠である。従って、患者において凝固を阻害する方法は、Ser., Ant., Aspir.,及び/又は、他の抗凝固剤 (triax) 中に少なくとも1つ以上の2) モノ酸修飾を有するファクターVIIを、凝固を抑制的に阻害するのに十分な量において投与することを示す。

典型的には、ヒトへの投与のため、医薬組成物は、修飾されたヒトファクターVII蛋白質並びに医薬として所定されるキャリヤー及び緩衝液を含んで成りであろう。

ヒト及びウシファクターVIIの好ましい形態において、活性部位基団Ser<sup>143</sup>が修飾され、Gly<sup>1</sup>、Met<sup>1</sup>、Thr<sup>2</sup>又はさらによくまではAla<sup>1</sup>により置換される。この様な蛋白質は、別々に行なうことができ、あるいはHis<sup>143</sup>及びAsp<sup>143</sup>を含む触媒的トライド中の他の部位においても修飾との組合せにおいて行なうことができる。

他の観点において、本発明は、それぞれアミンK-活性性血栓蛋白質のブレーブローベプチド及びArg<sup>143</sup>-Dメイシン、並びにLys<sup>143</sup>-Dメイシン不含有ファクターVII蛋白質をコードする2つの作用可能に連結された配列コード領域を含んで成るポリラクロオチド配列に因し、ここで発現の際に記載ポリラクロオチドは、血栓ファクターX又はIXを有意に活性化せず、そして凝固因子に結合することができる修飾されたファクターVII分子をコードする。このポリラクロオチドにより発現される修飾されたファクターVII分子は、生物学的に活性な抗凝固剤である。すなわちこれは、凝固カスケード、そしてそれ故にフィブリンの沈着又はクロットの形成を阻害することができ

る。この基盤されたファクターVIIを発現させるため、ポリアクリレオナド分子は、哺乳類細胞系、例えはBHK、BHK21、又は...、細胞系にトランسفェクトされる。

#### 図面の要旨的な説明

図はSer...→Xaa リボンファクターVII DNA配列のための発現ベクターの構造を示す。使用される記号は、0-1、すなわちSV40エンハンサー； MLP、すなわちアデノウイルス2主要後期プロモーター； SS、すなわち1組のスライス子、及びpA、すなわちSV40からの後期オリエンテーションのポリアデニレーションシグナルを含む。

#### 特定の酵素の記載

抗凝固活性を有する新規な修飾されたファクターVIIが本発明により提供される。この修飾されたファクターVIIはサイモゲン(すなわち、革革分子)の形態であってよく、又はその基質活性化部位において開裂されていてもよい。修飾されたファクターVIIの組成物は、触媒カスケードを操作するための複数の哺乳系、特にヒトに投与するためには適当である。修飾されたファクターVIIは他の抗凝固化合物と組合せて、又はそれに代えて投与することができる。

ファクターVIIは触媒カスケード、特に外因性(extrinsic pathway)を含むそれについて重要な役割を演ずる。凝血中に不活性な革革サイモゲン蛋白質として存在し、一旦活性化されれば、ファクターVIIは組織因子及びカルシウムイオンとの組合せにおいてファクターXを活性化し、そしてXをIXaに活性化し、最終的にフィブリングロットを形成せしめる。

本発明は、ファクターVIIaによるファクターX及びIXの活性

化を阻害又は阻害することにより、革革カスケード中の前記の革革の活性を阻害する能力を提供する。本発明のファクターVII蛋白質は、ファクターVIIaと触媒活性を低下させるよう修飾された触媒部位を有するが、この分子は組織因子に結合する能力を維持している。修飾されたファクターVII分子は、組織因子への結合について生來のファクターVII及び/又はVIIaと競争する。その結果、ファクターVII及びIXの活性化が阻害される。

本発明の1つの観点において、ファクターVIIaの触媒活性は触媒中心又はトライアドの化学的親等体化により阻害される。親等体化は、例えは、ファクターVIIaを、不可逆的殺害剤、例えば有機リソウ化合物、スルホニルフルオライド、ペプチドハロメチケートンもしくはアザペプチドと反応せしめることにより、又はアシル化により修飾される。好ましいペプチドハロメチケートンはPAPACK(D-Phe-Pro-Ara クロロメチケーン；米国特許No. 4,318,804、引用により本明細書に組み入れる)、及びDEPKK(ダニシル-Glu-Gly-Araクロロメチケーン)が含まれる。

他の観点において、ファクターVIIaの触媒活性はまた、アミノ酸を産生又は除去することによっても阻害される。好ましい観点において、アミノ酸変換は、ファクターVIIaの触媒部位に寄与するアミノ酸を有する領域として水酸化細胞において阻害されるファクターVIIaはトライアドのアミノ酸配列中で行われる。触媒トライアドの中の変換、挿入及び挿出は一枚の触媒部位を形成するアミノ酸において、又はその直近において行われる。ヒト及びウシのファクターVII蛋白質において、触媒トライアドを形成するアミノ酸はSer...、Asp...及びHis...である(詳細は配列中の変異を示す)。他の哺乳類からのファクターVII中の触媒部位は、特に蛋白質の革革及びアミノ酸配列分析を含めて現在利用可能な技術を用

いて決定することができる。触媒部位はまた、ある配列を他のセリンプロテアーゼ、特にその活性部位がすでに知られている(Siglerら、*J. Biol. Chem.* 251:143-144(1986)、引用により本明細書に組み入れる)キモトリプシンと平行させ、そして蛋白質から脱離の活性部位を決定することによっても決定することができる。

アミノ酸の変換、挿入又は除去は、ファクターVIIaによるファクターX及び/又はIXの活性化を阻害又は阻害するように行われる。しかしながら、この種の修飾されたVIIはまた、革革カスケード中の組織因子への結合について真正のファクターVII及び/又はファクターVIIaと競争する能力を維持しているべきである。この種の競争は、例えは本明細書に記載の凝固測定(clotting assay)、又は細胞表面凝固因子を用いるセルラーリン、例えはトロボラセセルラインJ5825xks1から、*J. Biol. Chem.* 264:6903-6908(1989)、引用により本明細書に組み入れる)を用いての競争結合測定により容易に決定することができる。

ファクターVII中の触媒部位を形成することができるアミノ酸、例えはヒト及びウシファクターVII中のSer...、Asp...及びHis...は置換されても又は除去されてもよい。本発明において、單一アミノ酸のみを変化させ、これによって、分子の活性性を増加させ又は組織因子に結合するその他の性質を阻害する可能性を最小化することができます。しかしながら2つ以上のアミノ酸変化(置換、付加、又は除去)を行うことができ、そして置換、付加及び除去(いずれも1又は複数)を行うこともできる。ヒト及びウシのファクターVII、Ser...は最もしくはAsp、Gly、Ser、Thr又は他のアミノ酸により置換されてもよい。AspをGlyにより、そしてThrをLys又はArgに置換するのが好ましい。一般に、更換は蛋白質の三次構造を可能な限り破壊しないように選択される。Dayhoffらのモデ

ル(Atlas of Protein Structure 1978, Nat'l Biomed. Res. Found., ワシントン D.C.) (引用により本明細書に組み入れる)を他のアミノ酸置換の選択におけるガイドとして使用することができる。ヒト、ウシ又は他の種の道徳なファクターVII配列の触媒部位に記載のように変化を導入し、そして得られた蛋白質を、触媒活性の測定及び生ずる抗凝固活性のレベルについて本明細書に記載するようにして測定することができる。修飾されたファクターVIIについて、触媒活性は実質的に、一般に対応する種の野生型ファクターVIIの触媒活性の約5%未満、さらには好ましくは約1%未満に、阻害される。

本明細書は修換DNA技術を用いて製造することができる。一般に、クローニングされた野生型ファクターVII DNA配列が所望の複合質をコードするよう導入される。次に、この修飾された配列が発現ベクターに組み入れられ、今度はこれが他の細胞に形質転換(transfect又はtransfect)される。高等真性細胞、特に無毛細胞の哺乳類細胞が生産細胞として好ましい。ヒトファクターVIIの完全なクレオチド配列及びアミノ酸配列が知られている。米国特許No. 4,784,950を参考のこと(引用により本明細書に組み入れる)。この特許明細書には、修換ヒトファクターVIIのクローニング及び発現が記載されている。ウシファクターVIIの配列はTakayaら、*J. Biol. Chem.* 263:14866-14872(1988)に記載されている(引用により本明細書に組み入れる)。

アミノ酸配列の変更は複数の技術により達成することができる。DNA配列の修換は既位特異的変異誘発により行うことができる。部位特異的変異誘発の技術は世界においてよく知られており、そして例えばZoller及びSmith (DNA 3:179-188, 1984)により記載されている。従ってファクターVIIのタクレオチド配列及びアミノ酸配列を用いて選択された変化を導入することができる。

本発明に従って修飾されたファクターVIIには、ビタミンK-依存性血凝蛋白質であるファクターI-X、ファクターX、プロトロンビン、プロテインC、プロテインS又はプロテインZのいずれか1つ以上のドメインより置換されたアミノ末端部(pleiotropin)を有する蛋白質が含まれる。ビタミンK-依存性血凝蛋白質のglaドメインは、γ-カルボキシグルタミン側鎖基の存在により側鎖付ければ、そして一般に約30-約40%ミノ酸の長さを有し、C-末端はそれぞれの置換子中のエクソントロン境界の位置に対応する。異種性glaドメインを有するファクターVIIを組成する方法は米国特許No.4,784,950に記載されており、引用により本明細書に組み入れる。

本発明において使用するためのDNA配列は、典型的にはファクターVII-蛋白質のアミノ末端にプレロブロブチドをコードしており、前述の翻訳後プロセシング(例えば、グルタミン側鎖基のγ-カルボキシル化)及び側鎖細胞からの分離が行われる。このプレロブロブチドは、ファクターVIIのそれでもよく、あるいは他のビタミンK-依存性血凝蛋白質、例えばファクターI-X、ファクターX、プロトロンビン、プロテインC又はプロテインSのそれであってよい。当業者は予測されるように、修飾されたファクターVIIのアミノ酸配列に追加の修飾を行うことができる、この場合これらの修飾は蛋白質が抗凝固因子として作用する能力を有するに留意しなきものである。例えば、保護中の米国特許出願No.7,471,313(引用により本明細書に組み入れる)に一般に記載されているように、触媒トライド中で修飾されたファクターVIIはまた、ダイメチジンであるファクターVIIのその活性化された2本鎖形の遮掩を防ぐために活性化開裂部位において修飾することができる。

本発明を実施するために使用するための発現ベクターは、クロ-

ン化遺伝子又はcDNAの転写を許すことができるプロモーターを含んで成るであらう。発現された哺乳類細胞において使用するための好ましいプロモーターには、ウイルス性プロモーター及び細胞性プロモーターが含まれる。ウイルス性プロモーターには、SV40プロモーター(Subramaniら、*Nat. Cell. Biol.* 1:854-864, 1981)及びCMVプロモーター(Boshartら、*Cell* 41:521-530, 1985)が含まれる。特に好ましいイルスプロモーターは、アデノウイルス2からの主要後縫プロモーター(Kaufman及びSharp、*Nat. Cell. Biol.* 2:1904-1919, 1982)である。細胞性プロモーターには、マウス・カッパー遺伝子プロモーター(Bergsmaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7041-7045, 1983)、及びマウスV。プロモーター(Lehら、*Cell* 33:85-93, 1983)が含まれる。特に好ましい細胞性プロモーターはマウス・メトロチオネイン-1プロモーター(Palmiterら、*Science* 222:809-814, 1983)である。発現ベクターはまた、プロモーターから下流であって且つファクターVII配列全体のための伸長部位から上流に位置するセッテインのRNAスライス部位を含有することができる。好ましいRNAスライス部位はアデノウイルス及び/又は先発クロブリン遺伝子から得ることができる。また、発現ベクター中にRNA記載部位からの下流に位置するポリアデニレーションシングナルが含まれる。特に好ましいポリアデニレーションシングナルには、SV40からの首型又は後縫ポリアデニレーションシングナル(Kaufman及びSharp、前項)、アデノウイルス5 ElB領域からのポリアデニレーションシングナル、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター(DeNofelら、*Nuc. Acids Res.* 9:3719-3730, 1981)、又はヒトファクターVII遺伝子もしくはウシファクターVII遺伝子からのポリアデニレーションシングナルが含まれる。発現ベクターはまた、サーコードウイルスリーダー配列、例えばプロモーターとRNAスライス部位との間に位置するアグノ

ウイルス2トリバルタイリーダー、及びエンハンサー配列、例えばSV40エンハンサーを含むことができる。

クローニングされたDNA配列を例へばリソマルカルシウム介在タンパクエクション(Wiglerら、*Cell* 14:725-732, 1978; Corsaro及びPearson、*Science Cell Genetics* 7:603-616, 1981; Graham及びVan der Eb、*Virology* 52:456-457, 1973)又はレクトロボリーション(Neumannら、*EMBO J.* 1:1841-1845, 1982)により、発現された哺乳類細胞に導入される。外来性DNAを発現する細胞を同定しして選択するため、選択可能な表現型を提供する遺伝子(選択マーカー)が一般に遺伝子の置換子又はcDNAと共に組み込まれる。好ましい選択マーカーには、遺伝子、例えばキオマイシン、ハイグロマシン、及びメソトリキセトに対する耐性を付与する遺伝子が含まれる。選択マーカーは増殖可視化選択マーカーであることができる。好ましい増殖可能な選択マーカーはジヒドロフラーート・レダクターゼ(DHFR)配列である。選択マーカーはThilly(*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA:引用により本明細書に組み入れる)により特許されている。選択マーカーの選択は当業者のレベルの範囲内である。

選択マーカーは、往々の置換子と同時に別のプラスミド上で細胞に導入することができ、あるいはそれらは同じプラスミド上で導入することができる。同じプラスミドの場合、選択マーカー及び往々の置換子は異なるプロモーター又は同じプロモーターの制御のもとに置くことができ、後者の配置はジシストロンメッセージを生成する。この型の構成物は商業界において知られている(例えば、Levinson及びSlemon、米国特許No.4,713,399)。細胞に導入される混合物に「キャリヤーDNA」として知られる追加のDNAを加えることも有利であろう。

細胞がDNAを取り込んだ後、これらを選択的な増殖培地中で典型的には1-2日間増殖させることにより往々の置換子の発現を開始させること。本明細書において使用する場合、「適当な増殖培地」は、細胞の増殖及び修飾されたファクターVII置換子の表現のために要求される栄養素及び他の成分を含有する培地を意味する。増殖培地一般に、酵素素、選択素、必須アミノ酸、必須酸、ビタミン、種々のホスホリポイド、蛋白質及び成長因子を含有する。テラガルキシル化され、修飾されたファクターVIIの生産のため、培地はビタミンKを、好ましくは約0.1μg/ml-約1.0μg/mlの濃度で含有するであらう。次に、必定に選択マーカーを表現している細胞の増殖について選択を行うために、寒天による選択が適用される。増殖可能な選択マーカーによってラジオヌクレオツトされた細胞のため、高放射量を増加させて増殖したヒト数のクローニング配列について選択し、これによって発現レベルを上昇させることができる。次に、玄にトランスクレクタされた細胞のクローニングを、修飾されたファクターVIIの表現についてスクリーニングする。

本発明において使用するための好ましい哺乳類セルラインには、COS-1(ATCC CCL 1650)、ベビーハムスター-腫瘍(BHK)及びB93(ATCC CRL 1573; Grahamら、*J. Gen. Virol.* 38:59-72, 1977)セルラインが含まれる。好ましいBHKセルラインは1K<sup>+</sup> 1a13 BHKセルライン(Waechter及びBassege、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1106-1110, 1982)、引用により本明細書に組み入れる)(BHK、BHK 570細胞と称する)である。このBHK 570セルラインはアメリカン・タイプ・カルデュア・コレクション(American Type Culture Collection)12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852に、ATCCアクセシジョンNo CRL 10314として販売されている。1K<sup>+</sup> 1a13 BHKセルラインはまた、アクセシジョンNo CRL 1632のものとATCCから入手することもできる。

さらに、多数の他のセルラインを本発明において使用することができる、これらには *Rat Hep I* (*Rat hepatomas:ATCC CRL 1800*)、*Rat Hep II* (*Rat hepatomas:ATCC CRL 1548*)、*TOMC* (*ATCC CCL 138*)、ヒト肺 (*ATCC HB 8065*)、*NCTC 1499* (*ATCC CCL 9.1*)、*CHO* (*ATCC CCL 6*)、及び *DUKX細胞* (*Urlsuh* 及び *Chasim*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4213-4220, 1980) が含まれる。

本発明に従って生産された修飾されたファクター-VII は、抗-Fa<sup>+</sup> ファクター-VII 抗体カラム上でのアフィニティクロマトグラフィーにより検出することができる。 *Wakabayashi, J. Biol.Chem.* 251: 11097-11108 (1976) 及び *Thim, Biochem.* 27:7785-7793 (1988) (引所により本明細書に組み入れる) により記載されたカルシウム依存性モルコーラル抗体の使用が特に好ましい。常用的の化学的精製手段、例えば、高速液体クロマトグラフィーによる追加の精製を組成することができる。ケニン酸バリウム沈降法を含めて、他の精製法が当業者において実施されており、本明細書に記載する革新的な修飾されたファクター-VII の製造のために適用される(一般に、 *Scopes, R., Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. 1982 を参照のこと)。少なくとも約 95%純度の実質的修飾されたファクター-VII が好ましく、38~98%はこれより高い均一性のものが、医薬用途のために最も好ましい。前記のように一旦部分的に又は完全に修飾されれば、次に、修飾されたファクター-VII を医薬に使用することができる。

本発明の 1 つの様様において、修飾されたファクター-VII はその活性部位において修飾されて、その 2 本紙形に転記される。活性化は、当業者において知られている方法、例えば *9stardal, Biochemistry* 11: 2857-2857 (1972); *Thomas, 米国特許 No. 4,456,501*; *Hedder* 及び *Kisiel, J. Clin. Invest.* 71: 1856-1861 (1983); 又は *Kisiel*

及び *Pujikawa, Beitrage Inst. Mitt.* 73:29-42 (1983) (これらを引用により本明細書に組み入れる) により記載された方法により行うことができる。次に、得られた薬剤された「ファクター-VII」は下記のようにして薬剤化されそして投与される。

本発明の薬剤されたファクター-VII 又は V-II α 分子は特に血管内膜層を含む限りの状態を治療するためにヒトに投与するためには有用である。例えば、深部静脈血栓症及び肺栓症は常に抗凝固剤により治療することができる。ここに記載する薬剤されたファクター-VII は、特徴された高危険患者、例えば、手術を受けたもの又は急性心臓血管の血栓塞栓合併症の発生を予防するために使用することができる。薬剤されたファクター-VII は、ヘパリンより選択的であって、一般に腫瘍部位に基づきされた組織因子との結合するので、そして薬剤されたファクター-VII は他の凝血蛋白質を競合しないので、深部静脈血栓症の子孫のために効率的に使用される場合、ヘパリンよりも効果があり、そして出血合併症を生じにくく。深部静脈血栓症の子孫のために記載されたファクター-VII の投与量は 70 kg の患者に対して約 50 ミリエー-25 mg/日の範囲、好ましくは 1~10 mg/日の範囲であり、そして投与は手術の少なくとも時間前に始まりそして少なくとも患者の歩行可能になるまで続けるべきである。完成した深部静脈血栓症及び/又は肺栓症において、薬剤されたファクター-VII の投与量は、患者の体重及び凝血の重症度に応じて、負担投与量 (loading dose) としての約 50 ミリエー-25 mg の範囲であり、これに続いて約 500 μg ~ 10 mg/日の量の持続投与量である。薬剤されたファクター-VII は、血栓切開術又は急性切開術と組み合わせた手術中又はその後にヘパリンの投与量を代替するか又は減少させることができる。

本発明の修飾されたファクター-VII は、心臓発生薬剤 (cardiogeni emboli) の予防及び急性心筋梗塞の治療において実質的な効果を有する。出血性合併症を惹起するその低い可能性及びその選択性のために、修飾されたファクター-VII は発作の患者に与えることができる、そして凝血活性性合併症の拡大を予防することができる。修飾されたファクター-VII の投与量は発作の性質及び重症度に応じて各患者ごとに異り、そして一般に下に示する範囲であろう。

ここに選択される薬剤されたファクター-VII の医薬成物は、修飾されたファクター-VII の体内内因性を阻害する能力のため、急性心筋梗塞における有効な治療剤であろう。修飾されたファクター-VII は凝血プラスミンゲンアカチベーター又はアストレプトキナーゼと共に、心筋梗塞の急性期に投与することができる。急性心筋梗塞においては、患者の多くとも約 1~25mg の修飾されたファクター-VII の負担投与量 (loading dose) 及びそれに続く約 500 μg ~ 10 mg/日の維持投与量が与えられる。

本発明の修飾されたファクター-VII は、致死性血管内塞栓 (DIC) の治療のために有用である。DIC の患者は、広く亢進した凝血機序を有しをしてしまえば、必ず凝固因子の消耗から生ずる抑制的な出血問題を有する。その選択性のため、修飾されたファクター-VII は、通常の抗凝固剤のようないつに開通する出血問題を悪化させず、追加の微小凝固フィブリン沈着の形成を防止又は阻害するであろう。

医薬成物は、予防的又は治療的効果のための非基盤的、又は局所的性とのために意図される。好ましくは、医薬成物は非経緯的、すなわち静脈内に、皮下に又は筋肉内に投与される。従って本発明は、片持されるキャリヤー、好ましくは水性キャリヤー

中に溶解した薬剤されたファクター-VII 分子の密度を含んで成る非経緯投与のための組成物を提供する。種々の水性キャリヤー、例えば水、蒸留水、0.4%氷結水、0.3%グリシン等を使用することがことができる。修飾されたファクター-VII はまた、医師の手袋への供給又は中薬のためにリボゾーム調製物に変換することもできる。リボゾーム調製物は一般に、例えば米国特許 No. 4,857,028, No. 4,610,726, 及び No. 4,375,282 に記載されており、これらの記載の範囲により本明細書に組み入れる。この組成物は通常のよく知られた安定化技術により安定化され得る。生ずる水溶液は使用のために包装され、あるいは無菌条件で凍結されそして凍結乾燥された。凍結乾燥された調製物は毎回に先立って無菌液体と混合される。この組成物は、生産の条件を遵守するために必要な場合に、医薬として貯蔵される被動蓄積、例えば調整及び保藏剤、米国特許第 4,761,286 及び No. 4,375,282 に記載されており、これらの記載の範囲により本明細書に組み入れる。この組成物は通常のよく知られた安定化技術により安定化され得る。生ずる水溶液は使用のために包装され、あるいは無菌条件で凍結されそして凍結乾燥された。凍結乾燥された調製物は毎回に先立って無菌液体と混合される。この組成物は、生産の条件を遵守するために必要な場合に、医薬として貯蔵される被動蓄積、例えば調整及び保藏剤、米国特許第 4,761,286 及び No. 4,375,282 に記載されており、これらの記載の範囲により本明細書に組み入れる。

すなわち、静脈注入のための典型的な医薬成物は、250 mg の無菌リゲル及び 10 mg の修飾されたファクター-VII を含有するようになることができる。非基盤的投与可能な組成物の調製のための実際の方法は当業者に知られており又は自明であり、そして例えば *Remington's Pharmaceutical Science* 18th, Mack Publishing Company, Easton PA (1982) に記載されており、この記載の範囲により本明細書に組み入れる。

修飾されたファクター-VII 分子を含有する組成物は、予防的及び

／又は治療的効果のために投与される。治療の適用において、上記のような病気をすでに有する患者に、疾患気及びその合併症を治療せし又は少なくとも停止させるのに十分な量で投与される。これを達成するための適当な量は「治療的効果」として定義される。このために効果的な量は疾患又は損傷の重症度並びに患者の体質及び一般状態に依存するであろうが、しかし一般に70kgの患者に対して約0.05mg～約0.1mgの薬物されたファクターVIIの範囲があり、1日量約0.5mg～約10mgの薬物されたファクターVIIがより一般的に使用される。本発明の物質は一般に重症の病気又は怪我、すなわち命にかかわる又は潜在的に命にかかわる状況において使用されるに留意しなければならない。この様な状況において、外來物質の減少化、及び薬物されたトロポファクターVIIのヒトに対する免疫原性の次回の投与点から、これらの薬物されたファクターVIIと組成物の実質的過剰量を投与することが可能でありそして治療する医師により好ましいであろう。

予防的適用において、薬物されたファクターVIIを有する組成物は、患者自身の凝固能を強化するために、病気の状態又は傷害に感受性の度合はその危険のある患者に投与される。この様な量は「予防的効果」として定義される。この適用において、正常な量はやはり患者の健康状態及び体質に依存するが、しかし一般に70kgの患者量より0.1mg～約25mgであり、より一般的には70kgの体重当たり約0.5mg～約10mgである。

組成物の1回投与又は多段回投与を行なうことができ、投与レベル及び投与ペースは治療する医師により選択される。終日維持レベルを必要とする歩行可能な患者のため、薬物されたファクターVIIは、例えはオータブルポンプ系を用いて持続注入により投与される。ともかく、医薬製剤は、患者を効率的に効能するのに十分な量

の本発明の新規されたファクターVIIを提供すべきである。

次の実験例は実験的ではなく示例的に提供される。

#### 実験例1

##### Serum→Xba I ファクターVII活性部位変性物を生成せしめるため、

プラスミドFVII (565+2483) /pDX (米国特許第4,784,850; 引用により本明細書に組み入れる: アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクションにアッセイ番号: 40203として登録されている)を Xba I 及び Kpn I により消化し、そしてセリソリ44のコード領域を含む生じた 0.8kb 断片を採取した。図に示すようにこの断片を Xba I 、 Kpn I 消化して M13mp19 にクローンングした。以下に記載するこの操作及び引き続き実験は一概に標準的なプロトコロル (例えば、Maniatisら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982) に記載されているごとく: 引用により本明細書に組み入れる) に従って行った。

実験原オリゴマクレオチド ZC1658 (5' - TGG GCG TCC GGC GTC CCC CCT-3') 及び 'ニヒバーサル' 第二ブライア ZC67 (5' - TCC CAC TCA CGA CGT-3') を用いて Zeller 及び Smith (同前) の方法に従って M13 型上でも実験選択を行なった。反応生成物を、ナーサーを処理された ZC1658 を用いてスクリーニングした。陽性ラリーを除い、そして変異 DNA を調製し、そして 1077 位の Pst I 位臵から 1213 の Kpn I 位臵まで配列決定した。配列分析は所定の実験の存在を確認した。実験原クローンを ZC1658 と命名をした。

次に、ZC1658クローンを用いて是変ベクターを作製した。是変誘発された配列を M13ベクターから～0.14kb の Pst I - Kpn I 断片として

実験した。図に示すように、この断片を FVII (565+2483) /pDX からの 1.7kb の Hind II - Xba I 断片、FVII (565+2483) /pDX からの 0.5kb の Xba I - Pst I 断片、及び FVII (565+2483) /pDX からの 4.3kb の Kpn I - Hind 断片と連結して、変異体クローン及び野性型クローンを Pst I で消化し、そして M13 中の変異体ファクターVII 部分を Kpn I 及び Xba I で消化し、濃化された DNA のサザンプロットを確認し、そしてサザンプロットを耐性標識した ZC1658 にまたプローブすることにより、目的とする変異体配列の存在を確認した。

ペーパーハムスターゼルセイインBH570 (アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクションにアッセイ番号: 10814として登録されている)を ZC1658 実験ベクターの 2 の株の細胞 (#544 及び #545 と称する) に取りトランスフェクションした。コンフルエンスなし 10cm プレートの BH570 細胞を 5 枚の 10cm プレート中、非選択培地 (10% のウシ胎児血清及び 1% の FBS 抗生剤混合物を含むする Delbecco 改良 Eagle 培地 (GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, MD) ) に希釈することにより細胞を標識した。24 時間後、細胞が 20～30% コンフルエンスに達した後、これらを、表 1 に示すように、ZC1658 変異をコードする変異ベクターの 1 のの単離体、プラスミド p488 (アデノウイルス 5 ori, SV40エンハンサー、アデノウイルス 2 主要構造プロモーター、アデノウイルス 2 リバーサライタリーダー、5' 及び 3' スプライス部位、DHRP cDNA 並びに SV40 グリアディレクションシングナルを pML-1 中に含んで成る (Lusky 及び Solchan, *Nature* 283:79-82 (1980) )、及び 15g のキャリア DNA 並びに新規したウサギ骨 DNA) にとじ用神絆膜形成 (10-transfection) した。DNA を 15mg のチューブに加え、そして 0.5ml の 2 × Hepes (25g の Hepes、40g の NaCl、1.8g の KCl、0.75g の NaFPO、2mM の

5g のデキストロースを 2.5L の蒸留水を加えし、そして pH を 8.5～7.0 に調整したものを封緘し、そして該チューブを混合した。各チューブ中の DNA を 0.5ml G0.25M CaCl<sub>2</sub> の添加により沈殿せしめ、この間に DNA / Hepes 濃度を通過してバブルルーピートにより空気を泡立てた。次に、チューブを過剰挿絶し、室温にて 15 分間インキュベートし、そして阿片毒素液を挿絶した。次に、DNA 混合物を細胞のプレート上にビペットを用いて撒き口した。プレートを再點滅させ、そして室温に 2 分間置いた。次に、培地をプレートから除去し、そして 2 ml の T18-食塗水を挿絶した。プレートを 2 分間室温にて置き、次にトリス - 食塗水を挿絶し、そして 10ml の非選択培地を置換した。プレートを 37°C にて 2 日間インキュベートした。

#### 表 1

##### トランスクローニング<sup>\*\*</sup>

プラスミド名	544	545	544対照	545対照
クローニング	15 μg	—	15 μg	—
クローニング 545	—	30 μg	—	30 μg
p488	1.5 μg	1.5 μg	—	—
キャリアDNA	1.6 μg	1.6 μg	1.6 μg	1.6 μg

2 日間のインキュベーションの後、細胞を選択培地 (10% の透析されたウサギ骨血清、1% の OPSN 抗生剤混合物及び 150mM メソト レキセトを含有する DMEM) 中に希釈し、そしてマクシプレート中 1 : 100、1 : 250 及び 1 : 250 の各割合でプレートした。プレートを 37°C にて 2 日間インキュベートした。1 選択後、培地を変え、そして選択培地を置換し、そしてプレートをコロニー形成についてチェックした。

8 日間の後、コロニー形成のあとで、#544 及び #545 トランス

## 特表平6-504678 (8)

フレクションプレートの 1 : 500 稀釈プレートから、12個のコロニーをサンプルに選択した。各クローンを 6-ケルクルプレートの 1 個のウェルにプレートし、そして選択培地中で増殖させた。7 日間の後、プレートはコンフルエンスになり、クローンを 1cm プレート中の選択培地中に分けた。

上記のクローン、及び野性型ファクター-VII の発現のためにランクシクテクトされた対照細胞を、<sup>35</sup>S-メチオニン-システィン、プロテインラベリングミックス (NNN DuPont Biotechnology Systems, Wilmington, DE) により代謝的に標識した。クローンを増殖せしめ、そして選択培地中でのバカラブル実験のために用意した。硫酸マトリクシン (Sigma, セントルイス, MO) によりすすぎ、そして 20 μCi/ml <sup>35</sup>S-Cys-<sup>35</sup>S-Met 中で 4 時間バルスした。5 時間後、上清及び細胞を吸引した。細胞を、Lem 及び Femsa (Cell 18:289-302 (1978)) により記載されているようにして実質的に溶解させ、そして 400 μl の硫酸脱脂液を 50 μl の Staph A (Sigma, セントルイス, MO) により沈殿させた。

代謝的に標識した細胞からのサンプルを、まず該サンプルを 5 μl の既成ファクター-VII ピリコターナ抗体と共に 4 時間 incubate することにより放射免疫沈降 (RIP) した。60 μl の洗浄したスクロフィロコス、プロテイン A を各サンプルに添加し、そしてサンプルを 4°C で 1.5 時間振りかじかした。サンプルを洗浄し、そして上清を除去した。ペレットを 0.7M RIPA 緩衝液 (10 mM Tris (pH 7.4)、1% デオキシキョウ酸 (Calbiochem Corp., La Jolla, CA)、1% Triton X-100、0.1% SDS、5 mM EDTA、0.7M NaCl) 中で 2 回、そして 0.15M RIPA 緩衝液 (10 mM Tris (pH 7.4)、1% デオキシキョウ酸 (Calbiochem Corp., La Jolla, CA)、1% Triton X-100、0.1% SDS、5 mM EDTA、0.15M NaCl) 中で 1 回洗浄した。

は、対照 (トランクシクテクトされていない) BHK 細胞-コンディション培地 (ピタシン K+/-)、野性型ファクター-VII、及び修飾されたファクター-VII を発現する細胞の 2 の单細胞について、測定の結果を基盤に算出して差す。ファクター-VII 活性は、対照サンプルを超えての凝固時間の比値として見られる。

表 2

サンプル	溶媒	凝固時間 (秒)
対照 + K	1 : 5	33.1
	1 : 10	33.4
対照 - K	1 : 5	34.3
	1 : 10	33.2
野性型ファクター-VII	1 : 20	19.0
	1 : 40	21.5
	1 : 80	23.3
修飾されたファクター-VII (#6)	1 : 1	33.5
修飾されたファクター-VII (#10)	1 : 1	32.5

血清ファクター-VII 濃度に対する修飾されたファクター-VII の効率を決定するため、修飾されたファクター-VII 及び既換え野性型又は生来型ファクター-VII の調製液をファクター-IX 又はファクター-IX のいずれかと共にインキュベートし、そしてその活性化を凝固測定又はポリアクリルアミドゲル電気泳動によってモニターティした。

実験前記

### 組織因子に結合する修飾されたファクター-VII の能力

組織因子に結合して野性型ファクター-VII と競争し、そしてその凝固活性を阻害する修飾されたファクター-VII の能力を、修飾された量の組織因子 (トランポラスチン) の存在下での一段階凝固測定

### 実験例 1

#### 修飾されたファクター-VII の抗一凝固活性

修飾されたファクター-VII 蛋白質の凝固を阻害する能力を、対照として野性型ファクター-VII を用いる一段階凝固測定により測定した。既換え蛋白質を、5 μg/ml のビタミン K を含有する培地中で増殖した細胞から本質的に上記のようにして調製した。種々の量の修飾されたファクター-VII (クローン 544 から) 又は既換え野性型ファクター-VII を 50nM Tris (pH 7.5)、0.1% BSA 中で 100 μl に希釈した。この混合物を 100 μl のファクター-VII 次級血漿 (George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS) 及び 200 μl のトランポラスチン C (Dade, Miami, FL; ラビットトランポラスチン及び 11nM Ca<sup>2+</sup> を含有する) と共にインキュベートした。

凝固測定は自動凝固時間測定器 (MIA Electro 800, Medical Laboratory Automation Inc., Pleasantville, NY) において行い、そして正常なブールされたヒト血漿 (1 ミリリットル/μl のファクター-VII 活性を有する) と予測される (健常な最後供給からのクエン酸脱脂した血清をブールすることにより調製した) の 1 : 5 = 1 : 840 寸数を用いて作成された標準曲線を用いて、凝固時間はファクター-VII 活性のユニットに変換した。この測定を用いて、修飾されたファクター-VII の調製液は換算し得る凝固活性を示さなかった。表 2

は、シテロ (トランクシクテクトされていない) BHK 細胞-コンディション培地 (ピタシン K+/-)、野性型ファクター-VII、及び修飾されたファクター-VII を発現する細胞の 2 の单細胞について、測定の結果を基盤に算出して差す。ファクター-VII 活性は、対照サンプルを超えての凝固時間の比値として見られる。

表 2

サンプル	溶媒	凝固時間 (秒)
対照 + K	1 : 5	33.1
	1 : 10	33.4
対照 - K	1 : 5	34.3
	1 : 10	33.2
野性型ファクター-VII	1 : 20	19.0
	1 : 40	21.5
	1 : 80	23.3
修飾されたファクター-VII (#6)	1 : 1	33.5
修飾されたファクター-VII (#10)	1 : 1	32.5

血清ファクター-VII 濃度に対する修飾されたファクター-VII の効率を決定するため、修飾されたファクター-VII 及び既換え野性型又は生来型ファクター-VII の調製液をファクター-IX 又はファクター-IX のいずれかと共にインキュベートし、そしてその活性化を凝固測定又はポリアクリルアミドゲル電気泳動によってモニターティした。

この測定は、野性型及び修飾されたファクター-VII を含有する培地が 1% 血清の血清を含むことを要求した。凝固時間は標準曲線の曲線に入るよう血清を PBS 中で行った。1 : 2 の最高値が典型的であった。最終体液は 100 μl であった。クローン #101 及び #6 と称する 2 の異なるヒトファクター-VII Serr.,-Ala 变形体を、この実験において試験した。下記の表に記載する結果は、ファクター-VII 变形体の量を増加するによってファクター-VII 活性の % が低下することを示した。

表 3

Ser <sub>101</sub> -Ala変形体についての混合固定の結果 (10μM / 混合 における 100% の活性としてBAIU (野性型) の活性を用いる)	混合固定の結果 (%)	VIIa と競争し、そしてその結果、ヒト血漿中のファクター-X 及 び/又は IX の活性化を阻害することができる。		
		混合固定の結果 (%)	活性 (%)	
クロラン	混合固定の結果 (%)	活性 (%)	活性 (%)	
#10	10μM	10μM	0	70
#10	20μM	10μM	0	51
#10	30μM	10μM	0	43
#10	40μM	10μM	0	34
#10	50μM	10μM	0	28
#10(X-)	20μM	10μM	0	76
#6	10μM	10μM	0	74
#6	20μM	10μM	0	56
#6	30μM	10μM	0	46
#6	40μM	10μM	0	41
#6	50μM	10μM	0	32
#6(X-)	20μM	10μM	0	85
BHK 対照	0	10μM	20μM	91
BHK 対照(-K)	0	10μM	20μM	107

(\*) トランスフェクトされていないコンデンション培地  
(\*\*) この記号 (\*\*) が付してあるもの以外は、ファクター-VIIa  
変形体の発現度を、粗細をピクタムの存在下で増殖させた。

これらの実験が示すところによれば、Ser<sub>101</sub>-Ala 置換を有する変形体は、量依存的にファクター-VIIa と競争し、そして天然ファクター-VIIa と競争のプロコアゲュエント活性を阻害した。従って、Ser<sub>101</sub>-Ala 変形体ヒトファクター-VIIa は生来のヒトファクター

## 表施別例

## ファクター-VIIa とPPACKとの反応

組換えファクター-VIIa、トランスフェクトされたベビーハムスター腎細胞において既報した。Thimら(Biochemistry 27:7785-7793, 1988)、Brinckmanら(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:1982-1986, 1988)、並びにBjörn及びThim(Reg.Disc. 16:289...564, 1988) (これらを、引用により本明細書に組み入れる) により示されているようにして、蛋白質を精製しそして活性化した。細胞培養液を回収し、雄鶏として精製して濃度を低下させた。次に、希釈した培地を、CaCl<sub>2</sub> を含むする培地種養液を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。ファクター-VIIa 部分を回収し、そしてカルシウム依存性状-ファクター-VIIaモノクローナル抗体を用いる免疫クロマトグラフィーによりさらに精製した。2つのオクタエチルクロマトグラフィー段階を用いて更なる精製を行い、この場合はファクター-VIIaをそれぞれ CaCl<sub>2</sub> 及び NaCl<sub>2</sub> を用いて溶出した。ファクター-VIIa が最終溶出液中に回収された。

50mM Tris-HCl、100mM NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4) 中組換えファクター-VIIa (1 μM) を 20 μM PPack (D-フェニルアラニル-ブロモリカルギニルクロメチルカチオン: Calbiochem, Darmstadt, CA) と共に、5、20及び30分間インキュベートした。次に、色原基質 S2288(H-D-イソイシシン-レフロリル-レアラギニン-p-ニトロアリド: Kabi Vitrum AB, Mölndal, スウェーデン) を含有する標準液を添加し、2.5倍の希釈及び 0.5mM S2288D 標准液度を得た。p-ニトロアリドの生成を測定し、そして对照として未処理のファクター-VIIa を用いる結果と比較した。結果が示すご

ろによれば、これらの濃度条件で約80分の後にファクター-VIIa は十分に不活性化される。

## 実験例V

## ファクター-VIIaとDEGRexとの反応

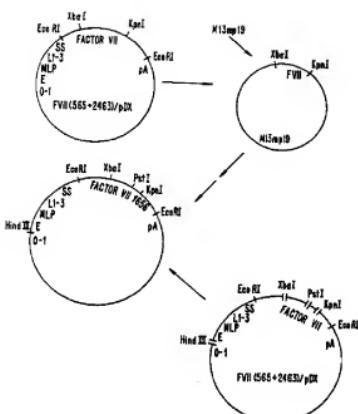
実験例IVに記載したようにして組換えファクター-VIIa を調製した。ファクター-VIIa (1 μM) を 0.05mM DEGRex(デングルシル-Gly-Gly-Lys クロロメチルカチオン: Calbiochem) と共に 37°C にて 1 時間、全体系 200 μM の 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl、0.5% BSA、pH 7.5 中でインキュベートした。インキュベーションの後、この混合物を一夜、4°C にて 2 までの 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl、pH 7.5 に対して透析した。

透析後のファクター-VIIa 次級固定の凝固時間の変化をモニターすることにより、精製されたファクター-VIIa の凝固活性を測定した。100 μM のサンプルを 100 μM ずつのファクター-VIIa 次級固定液、ヒト凝固トロンボグラスチン(Narworth, Thromb.Res. 44: 625-637, 1986) に記載されているようにして調製したもの) 及び 25 mM CaCl<sub>2</sub> と混合した。正常なプールされたヒト血漿の 1 : 5 ~ 1 : 200 倍稀釈を用いて作成した標準曲線から、凝固時間第Ⅱファクター-VIIa 活性度のユニットに変換した。ファクター-VIIa と DEGRex とのインキュベーションが、ファクター-VIIa 次級固定の完全な喪失をもたらすことが見出された。

以上の記載から、組織因子に結合することができるがしかしファクター-X 及び IX を活性化することが質的的にできない、精製された触媒部を有するファクター-VIIa 及びVIIa の凝固活性が提供されることが明らかである。精製されたファクター-VIIa は、凝固因子を分解又は消費することなく凝固カスケードを特異的に中断するため作用するので、精製されたファクター-VIIa 調製の段階に伴う不所

能の副作用は、現在の療法について既報されるのよりも少ないと予想することができる。さらに、ここに記載する修飾されたファクター-VIIa は組換え手段により容易に調製することができる。従って、低投与量の効率、便利さ及び経済性、及び低濃度の投与、並びに属性が相対的に無いことは、特に本明義により提供される利点である。

以上、本発明を、明確な理解のために説明及び実験例により幾分詳細に記載したが、提示される請求項の範囲内で後から変化及び変更を行うことができるることは明らかであろう。



### FIGURE

FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE RECORD SHEET		Information App	File No. PCT/US2012/01434
<p><b>V. <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATION WHERE CERTAIN CLAUSES WERE FOUND UNREASONABLE</b></p> <p>The unreasonable clauses have been highlighted in certain bolded words (bolded for the licensing purpose).</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Clause 21</b> (Paragraph 1) <b>Clause 2-5</b> are directed to a standard of treatment of the licensee that may not be the standard of treatment carried out and based on the alleged effects of compounds.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Clause 26</b> <b>Licensee</b> <b>shall</b> <b>not</b> <b>use</b> <b>any</b> <b>unreasonable</b> <b>restrictions</b> <b>in</b> <b>order</b> <b>to</b> <b>control</b> <b>the</b> <b>use</b> <b>of</b> <b>the</b> <b>substance</b> <b>in</b> <b>any</b> <b>other</b> <b>way</b>.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Clause 27</b> <b>Licensee</b> <b>shall</b> <b>not</b> <b>use</b> <b>any</b> <b>unreasonable</b> <b>restrictions</b> <b>in</b> <b>order</b> <b>to</b> <b>control</b> <b>the</b> <b>use</b> <b>of</b> <b>the</b> <b>substance</b> <b>in</b> <b>any</b> <b>other</b> <b>way</b>.</p>			
<p><b>VI. <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATION WHERE LACKING</b></p> <p>The observations are based on the information contained in the application file.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Clause 21</b> <b>Licensee</b> <b>shall</b> <b>not</b> <b>use</b> <b>any</b> <b>unreasonable</b> <b>restrictions</b> <b>in</b> <b>order</b> <b>to</b> <b>control</b> <b>the</b> <b>use</b> <b>of</b> <b>the</b> <b>substance</b> <b>in</b> <b>any</b> <b>other</b> <b>way</b>.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Clause 2-5</b> are directed to a standard of treatment of the licensee that may not be the standard of treatment carried out and based on the alleged effects of compounds.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Clause 26</b> <b>Licensee</b> <b>shall</b> <b>not</b> <b>use</b> <b>any</b> <b>unreasonable</b> <b>restrictions</b> <b>in</b> <b>order</b> <b>to</b> <b>control</b> <b>the</b> <b>use</b> <b>of</b> <b>the</b> <b>substance</b> <b>in</b> <b>any</b> <b>other</b> <b>way</b>.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <b>Clause 27</b> <b>Licensee</b> <b>shall</b> <b>not</b> <b>use</b> <b>any</b> <b>unreasonable</b> <b>restrictions</b> <b>in</b> <b>order</b> <b>to</b> <b>control</b> <b>the</b> <b>use</b> <b>of</b> <b>the</b> <b>substance</b> <b>in</b> <b>any</b> <b>other</b> <b>way</b>.</p>			

For more details about the survey, see [Official Journal of the European Union](http://www.officialjournaloftheEuropeanUnion.eu) (2010).

## フロントページの続き

(51) Inv.CI.\* 異別記号 庁内整理番号 F I  
 C 1 2 N 15/57 Z NA  
 //C 1 2 N 9/64  
 C 1 2 R 1:91)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N  
 L, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM  
 , GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT  
 , AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE,  
 DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, L  
 K, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO  
 , RU, SD, SE, US

(72) 発明者 バークナー, キャスリーン エル.  
 アメリカ合衆国, ワシントン 98199, シ  
 アトル, トゥエンティセカンド アベニュー  
 ウエスト 3032

(72) 発明者 ベテルセン, ラース クリストイアン  
 デンマーク国, デーコー-2970 ホエルス  
 ホルム, ハベバイ 4



は、Strategic Viewにより監査されている。請求権は認可の申請されたワークスーD。

以上のように、本件は、上記の要件により認定されている。請求資料に記載の郵送されたファク

$\mathcal{P} = \mathcal{V} \oplus \mathcal{A}$

図、Etc., 875. 又は如きにより置換されてゐる。請予稿件に記載の専門家名

第二十回 金玉奴贈金打秋香 賈母賜金玉良緣

17 ウン由来である、首次爆発に記載の前作されたファクター

VL, 

16. 実学的に発展である。新規項5-17のいずれか】項に記載の書約されたワ

（3） $\alpha$ の値を0.05とし、各回の測定値を用いて回帰直線の傾きを算出し、その平均値を算出せよ。

36. 繰り出しに専念する。飛沫飛8~10mといわれて1日に尼姑の体調が悪化?

$$\tau \in \mathbb{R} = \mathbb{R} \otimes \mathbb{R}$$

2) 植物園子への結合について馬鹿園ファーマーステムと競争する。清水をも

→10の1・2・3・4・5に5D版の脚本さがし、ラ・ラ・ラ・ラ・ラ

25. 2-5の作用・効用に導かれて、以下3-7の問題を読んで、最も近い問題を選んで、その番号を記入せよ。

（出典：日本経済新聞社「2018年版 世界の主要な経済指標」）

の脳癌トマトアフラビンに27%と最も多く、12973/脳癌患者でアフラビン68

有ラクターゼ異常をつづけており、この症候群の原因は乳酸菌由来ラクターゼ不耐症

・直捷アッパーX又は上Xを認知化する能力が漸次的に低下している複雑事象

たラッカーリーと日本手をコードする、これを隔物と名づけりラクレオナリ分野。

34. 第1項32名335名の内135名を除く200名に上記トランクル・タム丸太脚

影响女童生子率。

添、前記抽象的トライアドがヒトノクター- $\text{VII}$ のセラミン、ホホバ油及びリノールである、請求項に記載のセルライン。